 doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2016.04.10

临床研究

术前CD8$^+$CD28$^-$T细胞含量在预测肾癌患者术后复发中的作用

李华强[1],袁 坚[2],唐云峰[1],陈少娜[1]
[1]广东医科大学附属廉江市人民医院泌尿外科,广东 廉江 524400;[2]广州医科大学附属第一医院海印分院泌尿外科,广东 广州 510000

摘要:目的 探索术前CD8$^+$CD28$^-$调节性T细胞(Treg)含量在预测肾细胞癌(RCC)患者术后复发的效能。**方法** 术前检测33例接受肾癌根治术的RCC患者外周血CD8$^+$CD28$^-$Treg含量,术后进行为期60个月的随访,观察CD8$^+$CD28$^-$Treg与复发的关系,并与术前中性粒/淋巴细胞比值(NLR)进行对照。**结果** 共有9例患者出现复发,占27.27%,平均复发时间均数为术后24个月;复发患者的CD8$^+$CD28$^-$Treg及NLR数值均大于非复发组(P=0.034、0.041)。受试者工作曲线分析显示CD8$^+$CD28$^-$Treg及NLR均与RCC存在显著相关性,曲线下面积分别为0.819及0.703(P=0.004及0.021),且当CD8$^+$CD28$^-$Treg为8.21%时,其预测复发的敏感度为92.6%,特异度为90.5%,显著高于NLR。**结论** 术前CD8$^+$CD28$^-$Treg在预测RCC患者术后复发具有较理想的准确度,对于术前该细胞百分含量高于8.21%的患者需在术后2年内加强随访。
关键词:肾细胞癌;CD8$^+$CD28$^-$调节性T细胞;中性粒/淋巴细胞比值;受试者工作曲线;敏感度;特异度

The efficiency of pre-operative CD8$^+$CD28$^-$T cells to predict recurrence for patients with renal cell carcinoma

LI Huaqiang[1], YUAN Jian[2], TANG Yunfeng[1], CHEN Shaona[1]
[1]Department of urology, the Affiliated Lianjiang People's Hospital of Guangdong Medical University, Liangjiang, Lianjiang 524400, China;
[2]Department of urology, the First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To explore the efficiency of pre-operative CD8$^+$CD28$^-$T cells to predict recurrence for patients with renal cell carcinoma (RCC). **Methods** Preoperative detection of 33 cases with kidney cancer in RCC patients with peripheral blood CD8$^+$CD28$^-$Treg content, for 60 months of follow-up, postoperative observation of CD8$^+$CD28$^-$Treg and recurrence relations, and compared with preoperative neutral grain/lymphocyte ratio (NLR) were compared. **Results** A total of 9 cases of patients with recurrence, accounted for 27.27%, the average recurrence time mean for 24 months after surgery; Patients with recurrence of CD8$^+$CD28$^-$Treg and NLR numerical group were greater than the recurrence (P=0.034, 0.041).Subjects work curve (ROC) analysis showed that CD8$^+$CD28$^-$ there was a significant correlation with RCC Treg and NLR, the area under the curve (AUC) were 0.819 and 0.703 (P=0.004 and 0.004), and when CD8$^+$CD28$^-$Treg was 8.21%, the sensitivity of the recurrence of its predictions for 92.6%, 90.5%, significantly higher than that of NLR. **Conclusion** Preoperative CD8$^+$CD28$^-$Treg in predicting recurrence of patients with RCC has ideal accuracy, for the cell percentage is higher than 8.21% of patients with preoperative need strengthen follow-up of 2 years after surgery.
Key words: renal cell carcinoma; CD8$^+$CD28$^-$ regulatory T cells; neutral grain/lymphocyte ratio; receiver operating characteristics curve; sensitivity; specificity

肿瘤预后的预测是癌症防治的重要环节。目前对于肾细胞癌(RCC)预后的判断多依赖影像学手段如MRI等[1],但其费用高,患者难以在随访中进行重复检查。血清肿瘤标记物(TM)是早期诊断肿瘤的重要实验室指标,也是判断预后的关键分子[2]。遗憾的是,RCC不像其他实体瘤在外周血高表达某些TM从而利于诊断及预后判断。近年有研究发现术前中性粒/淋巴细胞比值(NLR)在预测RCC预后具有较高的敏感性,被认为是肿瘤预后判断的简单易行指标,但进一步的研究发现其特异性不够理想[3]。笔者先前研究发现RCC患者CD8$^+$CD28$^-$调节性T细胞(Treg)的表达升高,在术后可下降,且其与分期均呈显著正相关性[4],提示该T细胞在RCC发病机制起重要作用。为此推测CD8$^+$CD28$^-$Treg可能有助于预测RCC的复发。为验证该假象,本研究采用了受试者工作曲线(ROC)对CD8$^+$CD28$^-$Treg的判断效能进行分析。过程如下。

收稿日期:2016-06-07
基金项目:湛江市科技计划项目(2012C3106059)
作者简介:李华强,主治医师,E-mail: dgfkhcw@126.com
通信作者:袁 坚,主任医师,E-mail: gymnwkyj@sina.com

1 资料与方法

1.1 患者资料

选取2005年1月~2013年6月我院收治的RCC患者作为研究对象。入选条件为:术前经肾穿刺活检确诊

为RCC;同意行肾癌根治术;同意随访。排除标准为:合并免疫性疾病;合并其他原发性肿瘤;妊娠[5]。共入选33例,其中男20例,女13例;首诊年龄5~67岁,病程3个月~5年;其中右侧肾癌18例,左侧15例。

1.2 术前指标检测

$CD8^+CD28^-$Treg于术前1日清晨空腹采集肘静脉血约5 mL,抗凝后采用Ficoll分离获得外周血单个核细胞,随后应用尼龙毛柱获得T淋巴细胞,采用免疫磁珠法分离出$CD8^+CD28^-$Treg。使用Beckman coulter cell多色流式细胞仪检测$CD8^+CD28^-$Treg的百分含量[6]。在同一时间点采集静脉血行血常规检测,并计算中性粒/淋巴细胞比值(NLR)。

1.3 手术治疗

以上患者均行"肾癌根治术"[7],其中行区域性淋巴结清扫者22例,作系统扩大淋巴结清扫者13例;术中切除患侧肾上腺者4例;伴有静脉瘤栓的5例患者行静脉切开取出瘤栓;经腰第11肋间切口入路者4例,经腹肋缘下切口2例,经腹直肌切口2例。

1.4 随访与指标评价

对以上患者进行计划60个月(5年)的随访。随访方式为复诊、邮件、电话、QQ等。当影像学或病理学提示患者再度出现新发癌肿则判断为复发[8]。

1.5 统计学处理

定量资料采用均数±标准差表示,使用两独立样本t检验比较两组间的定量指标差异;例数的构成比较采用百分百表示;使用ROC法进行$CD8^+CD28^-$Treg预测复发的敏感性及特异性评价[9]。运用统计软件包SPSS 17.0处理数据,当$P<0.05$认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复发情况

共有9例患者在随访期内出现复发,占27.27%,均为Ⅲ~Ⅳ期患者。另24例在结束60个月随访时仍存活(72.73%)。复发出现的时间区间为首次治疗后的13~35个月,平均24.2±10.8个月。

2.2 两组的$CD8^+CD28^-$Treg及NLR比较

复发组的$CD8^+CD28^-$Treg含量显著高于未复发组,两组差异具有统计学意义(P=0.034)。复发组的NLR显著高于复发组(P=0.041,表1)。

表1 两组患者$CD8^+CD28^-$Treg及NLR的数值比较

指标	$CD8^+CD28^-$Treg (%)	NLR
复发组	5.16±1.32	2.13±0.54
未复发组	6.63±1.51	3.65±1.23
t	-2.019	-1.873
P	0.034	0.041

2.3 预测RCC复发的ROC分析

经ROC分析,发现$CD8^+CD28^-$Treg的曲线下面积(AUC)为0.819,其与复发存在显著相关性(P=0.004)。截值分析显示,当$CD8^+CD28^-$Treg为8.21%时,其预测复发的敏感度为92.6%,特异度为90.5%。NLR的AUC为0.703,最佳截值为3.02,对应的敏感度为86.29%,特异度为88.42%(图1)。

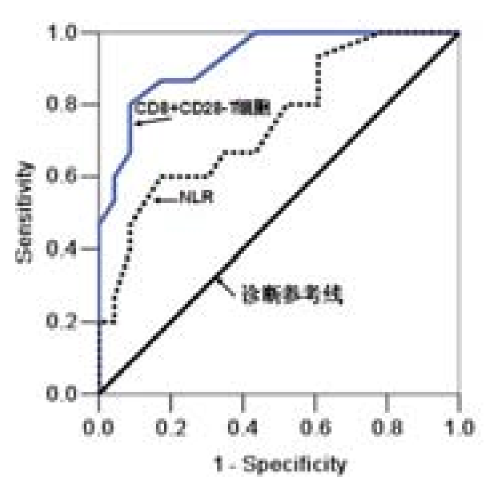


图1 $CD8^+CD28^-$ Treg预测RCC复发的ROC图

3 讨论

CD28分子又称为共刺激分子,在某些情况下可以被表达于$CD8^+$T细胞从而成为活化的$CD8^+$T细胞,后者具有免疫杀伤、吞噬癌变细胞等作用。反之,$CD8^+CD28^-$Treg是指细胞膜不表达CD28分子的一类$CD8^+$T细胞[10]。由于$CD8^+CD28^-$T细胞具有免疫增强及减弱的双重功能,从而被归属Treg。Treg是个"两面手",在某些慢性炎症性疾病可以起到正面的抑炎作用[11];但对于某些肿瘤如肝癌、肺癌等,$CD8^+CD28^-$Treg却由过强的免疫抑制作用导致了免疫耐受,即"人瘤共存"的局面,使机体抗肿瘤潜力无法得到发挥[12]。笔者在前期研究发现$CD8^+CD28^-$Treg与RCC分期及手术治疗存在显著相关性的基础上[4],进一步探讨$CD8^+CD28^-$Treg判断RCC复发的作用,旨在深入探索$CD8^+CD28^-$Treg的临床意义。

本研究数据显示,33例RCC术后患者当中共有9例患者在随访期内出现复发,占27.27%,该比例较王书华[13]等有所升高,其原因包括:(1)以上复发患者均为Ⅲ期(n=3)及Ⅳ期(n=6);(2)复发患者的癌栓发生率较高(5/9,55.56%),手术难以完全清除癌栓细胞。本研究数据显示33例RCC患者的5年存活率为72.73%,同样低于张海民等[14],其原因与复发大体相同。平均复发时间区间为术后24个月,提示术后2年内需加强随访,并在随访期内监测$CD8^+CD28^-$Treg变化趋势,从而为临床决策提供参考。

在 $CD8^+CD28^-$Treg 及 NLR 判断预后的效能方面，复发组的 $CD8^+CD28^-$Treg 含量显著高于未复发组，且复发组的 NLR 显著高于复发组；从单纯的 t 检验看，两项指标均具有预测价值。但究竟哪个指标更为理想，则需要进一步的分析。经 ROC 统计，发现 $CD8^+CD28^-$Treg 的曲线下面积大于 NLR，且截值分析显示，当 $CD8^+CD28^-$Treg 为 8.21%时，其敏感度及特异度均已大于 90%，明显优于 NLR 取值为 3.02 时所对应的数值，从而判断 $CD8^+CD28^-$Treg 的预测效能更优。

$CD8^+CD28^-$Treg 在预测 RCC 复发的敏感度及特异度优于 NLR 的原因包括：（1）尽管 $CD8^+CD28^-$Treg、中性粒细胞（N）及淋巴细胞（L）都是细胞结构，但是功能却有极大差异，且对于肿瘤发病机制及预后的占比有明显区别；（2）NLR 在肿瘤的重要性是基于"肿瘤微环境"即机体炎性状态理论[13]，该理论认为很多类型肿瘤源于感染、炎症和慢性刺激等，肿瘤基质中淋巴细胞减少，机体抗肿瘤免疫效应减低；另一方面，肿瘤浸润性导致中性粒细胞升高并释放大量炎症因子，从而构成一个 N/L 的平衡[15]；但对于 RCC 术后患者，该病理生理学现象有所不同：手术剔除病灶后，由于瘤体的消失或缩小，N 及 L 的比例改变，N/L 的平衡显得不明显，因此决定术后转归的主要因素在于免疫力，因此代表免疫力成分的 $CD8^+CD28^-$Treg 所起作用更为重要。

$CD8^+CD28^-$Treg 是 RCC 患者的不利因素，其预测 RCC 术后复发的效能优于 NLR，尤其是术前 $CD8^+CD28^-$Treg 高达 8.21%的患者需高度注意术后复发的可能，并嘱咐患者术后加强随访，此为本研究的重要临床意义。本研究的不足包括：随访时间不够长及样本量较小，以上将在后续的研究进行优化。

参考文献：

[1] Wu GY, Suo ST, Lu Q, et al. The value of blood oxygenation Level-Dependent (BOLD) Mr imaging in differentiation of renal solid mass and grading of renal cell carcinoma (RCC): analysis based on the largest Cross-Sectional area versus the entire whole tumour[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123431-4.

[2] 高 锐, 张 诚. 肾癌预后分子生物标记物研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(14): 2781-4.

[3] 郭晓波. 肾癌患者外周血中性粒细胞淋巴细胞比值与其预后的关系分析[J]. 长治医学院学报, 2016, 30(2): 121-4.

[4] 李华强, 袁 坚, 唐云峰, 等. 肾癌根治术患者手术前后 $CD8^+CD28^-$T 细胞表达及临床意义[J]. 岭南现代临床外科, 2015, 15(2): 219-21.

[5] 张义静, 李海龙, 白 津, 等. 术前中性粒/淋巴细胞比率与非转移性肾癌术后生存的相关性研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2015, 30(11): 1004-9.

[6] Mella M, Kauppila JH, Karihtala P, et al. Tumor infiltrating CD8(+) T lymphocyte count is Independent of tumor TLR9 status in treatment naïve triple negative breast cancer and renal cell carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(6): e1002726-30.

[7] 高燕华, 高春芳, 王道元, 等. 肾癌患者手术及免疫治疗前后的血清蛋白指纹图谱的研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2014, 29(3): 191-5.

[8] Weiss JM, Gregory AW, Quiñones OA, et al. CD40 expression in renal cell carcinoma is associated with tumor apoptosis, CD8(+) T cell frequency and patient survival[J]. Hum Immunol, 2014, 75(7): 614-20.

[9] Kwon T, Jeong IG, Yoo S, et al. Role of MRI in indeterminate renal mass: diagnostic accuracy and impact on clinical decision making [J]. Int Urol Nephrol, 2015, 47(4): 585-93.

[10] Echeverría A, Moro MA, Asensi V, et al. $CD4^+$ CD28null T lymphocytes resemble $CD8^+$ CD28null T lymphocytes in their responses to IL-15 and IL-21 in HIV-infected patients[J]. J Leukoc Biol, 2015, 98(3): 373-84.

[11] Wang L, Zhao C, Peng Q, et al. Expression levels of CD28, CTLA-4, PD-1 and Tim-3 as novel indicators of T-cell immune function in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Biomedical reports, 2014, 2(2): 270-4.

[12] Atzin-Méndez JA, López-González JS, Báez R, et al. Expansion of quiescent lung adenocarcinoma $CD8^+$ T cells by MUC1-8-mer peptide-T2 cell-β2 microglobulin complexes[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 33-42.

[13] 王书华, 廖文峰, 林 瑞, 等. 术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞的比值和肾癌预后的关系[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(11): 812-7.

[14] 张海民, 彭 波, 许云飞, 等. 术前外周血中性粒细胞淋巴细胞比值在肾癌的诊断及预后中的作用[J]. 临床泌尿外科杂志, 2015, 30(8): 698-701.

[15] Xie P, Yang Z, Yuan Z. Lipid-poor renal angiomyolipoma: Differentiation from clear cell renal cell carcinoma using wash-in and washout characteristics on contrast-enhanced computed tomography[J]. Oncol Lett, 2016, 11(3): 2327-31.